

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : 2 678 639

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 91 08294

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.07.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 08.01.93 Bulletin 93/01.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : Dumas Milne Edwards Jean-Baptiste et  
Mallet Jacques.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Rhône-Poulenc Rorer S.A. Direction  
Brevets.

⑤4 Procédé de clonage d'acides nucléiques.

⑤7 L'invention concerne un procédé de clonage d'acides  
nucléiques comprenant une étape de ligature, à l'extrémité  
3' d'un produit d'extension d'amorce, d'un oligonucléotide  
simple brin, non complémentaire dudit produit d'extension  
d'amorce, et une étape de synthèse du deuxième brin en  
utilisant une amorce complémentaire dudit oligonucléotide,  
éventuellement suivie de réactions d'amplification.

FR 2 678 639 - A1



La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire. Plus particulièrement, elle concerne un procédé de clonage d'acides nucléiques, une trousse pour sa mise en oeuvre, et ses applications.

5 L'un des enjeux de la biologie moléculaire réside dans l'étude et la caractérisation des acides nucléiques constituant le patrimoine génétique de chaque cellule (ADN) ou des intermédiaires obligés de la synthèse protéique (ARN). L'isolement et l'immortalisation de ces molécules au sein d'hôtes procaryotes ou eucaryotes (autrement appelé le clonage) constitue donc une étape clé dans l'approche moléculaire de la physiologie cellulaire.

10 Les techniques de clonage connues font généralement appel à une succession d'étapes classiques. Il s'agit en premier lieu d'extraire les ARN d'une cellule (ARN totaux ou ARN messagers). Ensuite, compte tenu du fait que ces molécules sont rapidement dégradées, il est nécessaire de réaliser leur rétrotranscription en ADN complémentaires simple brin (ADNc-sb) plus stables. Les molécules simple brin ainsi  
15 obtenues sont appelées produits d'extension d'amorce. Enfin, l'ADN *in vivo* étant une molécule bicaténaire, il est nécessaire, pour incorporer l'ADNc-sb à un vecteur de clonage (plasmide, cosmide, phage ..), de transformer la molécule monocaténaire en une molécule bicaténaire : ADN complémentaire double brin (ADNc-db). Cette dernière étape consiste à synthétiser un brin complémentaire d'ADN en se basant sur  
20 le brin matrice que constitue l'ADNc-sb. Elle est réalisée au moyen d'enzymes (ADN polymérases), qui sont capables de recopier un brin matrice, en allant de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Toutefois, ces enzymes ont besoin d'une amorce pour débiter la synthèse du nouveau brin. Selon les techniques de l'art antérieur, cet amorçage peut être obtenu de plusieurs façons :

25 Tout d'abord, par auto-amorçage. En effet, pour des raisons qui ne sont pas encore élucidées, une structure en épingle à cheveux se forme fréquemment à l'extrémité 3' de la molécule d'ADNc-sb. Cette structure peut être utilisée pour amorcer la néosynthèse du brin complémentaire de l'ADNc-db.

30 L'amorçage peut également être réalisé grâce à des fragments de l'ARN initial. En effet, l'étape de rétrotranscription de l'ARN extrait génère des hétéroduplex ADNc-sb/ARN, qui sont normalement convertis en ADNc-sb par digestion par l'ARNase H. Cependant, selon les conditions choisies, cette digestion peut n'être que partielle, et la néosynthèse du deuxième brin peut alors être amorcée au niveau des fragments d'ARN persistants.

L'amorçage peut enfin être obtenu après addition d'une queue homopolymérique à l'extrémité 3' de l'ADNc-sb. Dans ce cas, la synthèse du deuxième brin est amorcée avec un oligonucléotide consistant en un homopolymère complémentaire de celui ajouté à l'ADNc-sb.

5        Toutefois, les techniques décrites ci-dessus présentent certains inconvénients, qui limitent leurs applications. Notamment, les étapes d'amorçage ne peuvent pas toujours être correctement contrôlées, et la spécificité de l'appariement de l'amorce, spécialement dans le cas d'une amorce homopolymérique, est limitée, générant un bruit de fond non négligeable. Par ailleurs, les clones obtenus avec des  
10    ADNc-db amorcés à l'aide d'épingles à cheveux ou de fragments d'ARN sont, par construction, incomplets dans la partie correspondant à l'extrémité 5' des ARN (ou 3' du produit d'extension d'amorce).

Enfin, l'utilisation de ces techniques ne permet pas la réalisation de banques d'ADNc de populations cellulaires à effectif restreint. En effet, l'expérience montre  
15    qu'il est pratiquement impossible de réaliser des banques d'ADNc si la quantité d'ARNm ayant servi de matrice à la rétrotranscription est inférieure à quelques centaines de nanogrammes. De telles quantités sont obtenues à partir de quelques dizaines de milligrammes de tissu frais, ou encore, de  $10^7$  et plus cellules en culture. Ainsi les noyaux de cerveau humain, les embryons, les cultures primaires de cellules,  
20    les biopsies d'organes ou de tissus malades, les formes non libres de parasites, etc, ne peuvent être facilement utilisés comme matériel de départ pour construire des banques d'ADNc. L'utilisation des techniques d'amplification d'ADN *in vitro* pourrait permettre d'atteindre la masse critique d'ADNc nécessaire au clonage. Toutefois, ces techniques ne peuvent s'appliquer qu'à des fragments d'ADN dont les extrémités sont  
25    connues.

La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. En effet, la demanderesse a maintenant mis au point un procédé de clonage d'acides nucléiques permettant de générer des clones entiers, notamment au niveau des régions 5' des  
30    messagers, avec une grande spécificité. Le procédé de l'invention permet également la synthèse, et par la suite l'amplification, de molécules d'ADNc-sb dont les extrémités sont inconnues, à partir de peu de matériel (cellules, ADN, ARN).

Un objet de l'invention réside donc dans un procédé de clonage d'acides nucléiques caractérisé en ce que l'on effectue les étapes suivantes :

- dans une première étape, la ligature à l'extrémité 3' d'un produit d'extension d'amorce, d'un oligonucléotide simple brin, non complémentaire dudit produit d'extension d'amorce,

- dans une deuxième étape, la synthèse du deuxième brin au moyen d'une  
5 ADN polymérase, en utilisant une amorce complémentaire dudit oligonucléotide, et,  
- dans une troisième étape facultative, l'amplification de l'ADNc-db ainsi obtenu.

Dans ce qui suit, l'oligonucléotide simple brin et non complémentaire est désigné par le terme oligonucléotide.

- 10 Dans un mode préféré de l'invention, le procédé met en oeuvre un produit d'extension d'amorce obtenu à partir d'une matrice ARN. Il peut s'agir d'ARN totaux, comme d'ARN messagers (ARNm) ou d'ARN ribosomaux (ARNr). La préparation des ARN totaux peut être réalisée selon différents protocoles connus de l'homme du métier. Notamment, la technique décrite par Belyavsky et al (Nucleic Acids Res. 17  
15 (1989) 2919-2932) ou des techniques dérivées de celle-ci peuvent être utilisées. Dans le cas où la matrice initiale est constituée par un ARNm polyadénylé en 3', celui-ci peut être extrait par chromatographie d'affinité vis-à-vis de l'extrémité polyA.

- La rétrotranscription des ARN extraits peut être effectuée par des procédés connus de l'homme du métier, directement à partir de préparations d'ARN totaux, ou  
20 à partir d'ARN du type recherché (ARNm, ARNr). L'amorce utilisée pour cette réaction est préférentiellement bloquée en 5', pour éviter la formation de concatémères des ADNc-sb lors de l'étape de ligation. A titre d'exemple, les conditions de rétrotranscription décrites par Rhyner et al (J. Neurosci. Res. 16 (1986) 167-181), éventuellement adaptées en fonction de la quantité d'ARN de départ,  
25 peuvent être utilisées pour préparer le produit d'extension d'amorce mis en oeuvre dans la présente invention.

- Dans un autre mode particulier de l'invention, le procédé met en oeuvre un produit d'extension d'amorce obtenu à partir d'une matrice ADN. Il peut s'agir préférentiellement d'ADN génomique. En effet, l'une des applications  
30 particulièrement avantageuses du procédé de l'invention concerne la caractérisation moléculaire de séquences génomiques, et plus spécifiquement, de séquences génomiques impliquées dans le contrôle de l'expression de gènes connus.

- Dans ce cas, la matrice ADN simple brin peut être obtenue à partir d'ADN génomique total, éventuellement coupé au moyen d'enzymes de restriction, après  
35 dénaturation des molécules bicaténares. Le produit d'extension d'amorce est ensuite

synthétisé en utilisant une amorce correspondant à une région du gène étudié, puis purifié. En particulier, il peut être particulièrement avantageux d'utiliser pour la synthèse du produit d'extension une amorce biotinylée, qui permet une purification simple par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine.

5        Lorsque le produit d'extension d'amorce est synthétisé, les hétéroduplex sont convertis en ADNc-sb par traitement à l'ARNase H, et/ou par hydrolyse alcaline. Par ailleurs, il est également préférable d'éliminer l'amorce libre résiduelle, pour éviter les réactions secondaires de ligation entre l'oligonucléotide et l'amorce. Ceci peut être fait par exemple par chromatographie d'exclusion.

10        Au cours de la première étape du procédé de l'invention, on utilise préférentiellement pour la ligation un oligonucléotide synthétisé par voie chimique. La synthèse de cet oligonucléotide est réalisée en tenant compte du fait qu'il est essentiel d'utiliser un oligonucléotide non complémentaire du produit d'extension d'amorce, pour éviter l'amplification d'ADN allochtone.

15        Avantageusement, l'oligonucléotide utilisé est préalablement fonctionnalisé, pour éviter la formation de concatémères à la suite de son auto-ligation. La ligation s'effectuant entre l'extrémité 5'-phosphate de l'oligonucléotide et l'extrémité 3'-OH du produit d'extension d'amorce, il est toutefois indispensable de conserver l'extrémité 5' de l'oligonucléotide réactive. Dans ces conditions, la fonctionnalisation de  
20 l'oligonucléotide consiste à bloquer l'extrémité 3'. Préférentiellement, cette fonctionnalisation est faite de telle sorte que l'extrémité 5' comporte un phosphate et l'extrémité 3' ne comporte pas de radical hydroxyle. Ceci peut être réalisé en ajoutant à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide un 2'-3' didéoxyribonucléotide de formule ddXTP dans laquelle X peut être choisi parmi les bases connues entrant dans la compositions  
25 des acides nucléiques, telles que notamment l'adénosine, la guanine, la thymidine, etc. La fonction 3'-OH peut également être bloquée par amination, suivie ou non de l'addition d'une biotine.

30        Encore plus préférentiellement, on utilise un oligonucléotide ne formant pas de structure secondaire. De telles structures seraient en effet de nature à perturber, sinon la ligation, du moins l'étape de sytnhèse du brin complémentaire.

35        Par ailleurs, pour augmenter la spécificité de l'amplification *in vitro*, il est particulièrement intéressant d'utiliser des oligonucléotides ayant une température d'hybridation relativement élevée. Pour cette raison, un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention est obtenu avec un oligonucléotide ayant un GC% au moins égal à 60 %.

Dans une variante particulière de l'invention, on utilise un oligonucléotide dont les bases situées en 5' forment un ou plusieurs sites de coupure reconnus par des enzymes de restriction. Ceci permet la formation, par digestion enzymatique, de sites compatibles avec ceux d'un vecteur de clonage.

5 La longueur de l'oligonucléotide utilisé dans l'invention doit être suffisante pour permettre l'hybridation d'une amorce d'ADN polymérase. Préférentiellement, on utilise un oligonucléotide d'une longueur au moins égale à 20 mer. Pour une meilleure réalisation de l'invention, il peut être préférable d'utiliser un oligonucléotide ayant une longueur suffisante pour permettre la réalisation d'étapes supplémentaires d'amplification. Dans ces conditions, la longueur de l'oligonucléotide  
10 est avantageusement comprise entre 20 et 60 mer.

La ligation de l'oligonucléotide au produit d'extension d'amorce est effectuée préférentiellement au moyen d'une enzyme capable de lier des molécules simple brin. Préférentiellement, on utilise la T4 RNA ligase. Cette enzyme est connue pour sa  
15 capacité à lier des molécules d'ARN. La Demanderesse a maintenant montré que cette enzyme pouvait également être utilisée pour ligaturer des ADN sb, ou des oligonucléotides synthétiques à des produits d'extension d'amorce. La réaction de ligation est généralement effectuée à 20°C environ pendant une période de 24 à 96 heures. Il est entendu que la durée de la réaction peut être optimisée selon l'efficacité  
20 recherchée et la quantité de matériel disponible.

Les molécules simple brin hybrides ainsi formées contenant l'oligonucléotide lié en 3' du produit d'extension d'amorce peuvent ensuite être soumises à la seconde étape du procédé conduisant à la synthèse du deuxième brin. Cette étape met en oeuvre une ADN polymérase, dont l'activité est initiée par une amorce  
25 complémentaire de l'oligonucléotide. L'amorce complémentaire peut être synthétisée aisément par voie chimique, comme cela est décrit dans les exemples. Cette étape de synthèse du brin complémentaire peut être réalisée selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, il est possible d'utiliser différentes enzymes disponibles dans la technique, telles que le fragment Klenow de l'ADN polymérase de  
30 *E.coli*, ou des ADN polymérases thermostables, telles que l'enzyme TaqPol (Cetus), la Replinas (Beckman) ou l'Amplifase (Appligène). Des protocoles détaillés sont décrits dans les références mentionnées ci-après dans les techniques générales de clonage.

Les molécules double brin ainsi formées peuvent ensuite être soumises à une  
35 réaction d'amplification. Ceci peut être fait en utilisant, en plus de l'amorce ayant

servi dans la seconde étape du procédé, une deuxième amorce choisie dans la partie 5' du produit d'extension d'amorce. Cette réaction d'amplification peut notamment être réalisée selon des techniques connues de l'homme de l'art, telles que la "PCR" (Saiki et al., Science 239 (1988) 487-491). Par ailleurs, dans un mode particulièrement  
5 avantageux de mise en oeuvre de l'invention, la réaction d'amplification est réalisée simultanément à l'étape de synthèse du brin complémentaire (seconde étape du procédé). Dans ce cas, les deux amorces sont introduites ensemble, en présence de l'ADN polymérase.

De plus, plusieurs réactions d'amplification peuvent être effectuées  
10 successivement, en choisissant pour chaque nouvelle réaction des amorces définissant une région plus petite permettant ainsi des amplifications emboîtées ("nested amplification").

Selon cette variante du procédé, il est possible de cloner spécifiquement des acides nucléiques, en partant de très peu de matériel, et en l'absence de toute  
15 information concernant leur séquence.

Un autre objet de l'invention réside dans une trousse pour la mise en oeuvre du procédé de clonage d'acides nucléiques décrit ci-avant, comprenant l'oligonucléotide de ligation et éventuellement l'enzyme permettant sa ligation au produit d'extension d'amorce.

20 Selon une variante particulière de l'invention, la trousse comprend également les amorces et enzymes permettant la rétrotranscription de la matrice initiale ARN en ADNc-sb.

Selon une autre variante particulière de l'invention, la trousse comprend également les amorces et enzymes permettant l'amplification de l'acide nucléique  
25 cloné.

Ces troussees peuvent être utilisées de manière particulièrement simple et avantageuse pour réaliser des banques d'ADNc, ou pour cloner les régions 5' d'ARN messagers, ou encore pour l'étude et la caractérisation moléculaire de séquences  
génomiques.

30 D'autres avantages de la présente invention apparaitront à la lecture des exemples suivants, donnés à titre illustratif et non limitatif.

### Légende des figures

Figure 1 : Séquence et position respective des oligonucléotides BM 5', BM 1-5', BM 2-5', BM 3-5', BM 3', BM 1-3', BM 2-3' et BM 3-3'.

Figure 2 : Séquence et position des oligonucléotides spécifiques de la TPH  
5 utilisés lors du clonage du messager de la TPH-B. Les oligonucléotides de la série 5' décrits dans la figure 1 ont également été utilisés lors du clonage.

Figure 3 : Schéma représentant les différentes étapes du procédé de  
1 l'extrémité 5' d'ARN messagers. Dans le cas de la TPH, il a été nécessaire de réaliser la troisième étape  
10 d'amplification.

### Techniques générales de clonage

Les méthodes classiques de biologie moléculaire comme l'électrophorèse en gel d'agarose, la révélation des acides nucléiques au bromure d'éthidium, le transfert des acides nucléiques sur des membranes (de nylon) et la détection de séquences à  
15 l'aide de sondes sont décrites dans la littérature (Maniatis et al., Molecular cloning, A Laboratory manual, Second edition, 1989, Cold Spring Harbor, Laboratory press; Berger et Kimmel, Guide to molecular cloning techniques, Methods in enzymology 152, 1987, Academic press). De même les techniques comme la réparation d'ADN  
20 grâce à l'activité exonucléase 3'-5' de la T4 DNA polymérase, la ligation de "linkers", l'introduction de fragments d'ADN dans des vecteurs de clonage comme les bactériophages M13 ou lambda ZAP (Stratagène) sont bien documentées dans Maniatis et al. précité.

**Exemple 1** : Synthèse et fonctionnalisation d'oligonucléotides et amorces pour la mise en oeuvre de l'invention.

25 Différents oligonucléotides ont été synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites. La séquence de ces oligonucléotides est donnée sur la figure 1, ainsi que leurs positions respectives.

Les séquences BM 1-5', BM 2-5', BM 3-5', BM 1-3', BM 2-3' et BM 3-3',  
ont été utilisées comme amorces pour les amplifications successives ("nested  
30 amplifications").

La séquence BM 5' a été utilisée comme oligonucléotide de ligation.



La séquence BM 3' a été utilisée comme amorce pour la rétrotranscription des ARN totaux extraits des cellules PC12 (exemple 3).

La fonctionnalisation de l'oligonucléotide de ligation a été réalisée en présence de la transférase terminale, par ajout d'un 2'-3' didéoxyribonucléotide à l'extrémité 3'. Pratiquement, cette réaction se déroule avec : 500 ng d'oligonucléotide dans 25  $\mu$ l de milieu (Cacodylate de sodium 100 mM,  $\text{CoCl}_2$  1 mM, Tris-HCl pH=7.5 30 mM, albumine sérique de boeuf (ASB) 12.5  $\mu$ g, DDT 0.1 mM, dideoxy-adenosine-triphosphate (ddATP) 100 mM,  $[\alpha\text{-P}^{32}]$  2',3'-ddATP 2,5  $\mu$ Ci de la solution Amersham d'activité spécifique 3000 Ci  $\text{mM}^{-1}$ ) en présence de 25 unités de transférase terminale (Boehringer Mannheim) 1 heure à 37°C. Puis, l'enzyme est désactivée par la chaleur (10 minutes à 75°C). Les 25  $\mu$ l sont chargés sur un gel de polyacrylamide et la bande correspondant à l'oligonucléotide modifié est excisée et transférée dans une cartouche SPIN-X (Costar). 200  $\mu$ l d'eau sont ajoutés à l'acrylamide et l'ensemble est congelé dans de la carboglace puis décongelé plusieurs fois. La cartouche est ensuite centrifugée (12000 rpm, 5 minutes), l'éluat est précipité [Dextran T 40 (Pharmacia) 0.5  $\mu$ g, 0.5 M LiCl, 75 % éthanol] puis dissous dans 50  $\mu$ l d'eau et stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation.

**Exemple 2 :** Clonage des messagers entiers de la Tryptophane Hydroxylase de la glande pinéale de rat (TPH-B).

L'ARNm codant pour la Tryptophane Hydroxylase de la glande pinéale de rat présente un polymorphisme au niveau de l'extrémité 5'. Deux formes sont actuellement caractérisées : TPH- $\alpha$  et TPH-B. Comme indiqué sur la figure 2, TPH- $\alpha$  est comprise dans TPH-B. Par ailleurs, TPH- $\alpha$  est relativement abondante (0,5 % des messagers totaux), et est à peu près 100 fois plus représentée que TPH-B. La capacité à cloner TPH-B constitue un bon test d'efficacité d'un procédé de clonage.

Les ARN totaux d'une glande pinéale de rat sont extraits selon la méthode de Belyavsky (précité). 25 % des ARN ainsi obtenus, soit 200 ng environ, sont utilisés pour réaliser le clonage des extrémités 5' du messager de la TPH selon le schéma général décrit dans la figure 3.

**2.1. Synthèse des ADNc-sb**

La rétrotranscription est réalisée au moyen de l'amorce PEX, dont la position sur l'ARN matrice et la séquence sont données sur la figure 2. Six picomoles d'amorce ont été utilisées, et, pour obtenir un marquage détectable du produit d'extension d'amorce, une première extension de 40 min. est réalisée à 42°C en

présence de 0,05 mM de dCTP et 0,5 mCi/ml de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP. Après avoir ramené la concentration en dCTP à 0,5 mM, la synthèse est prolongée de 40 minutes.

L'excès de PEX est ensuite éliminé par chromatographie d'exclusion. Pour cela, le produit de la rétrotranscription auquel est ajouté 4  $\mu$ l d'EDTA 0,5M est  
5 déposé sur une colonne chromatographique de 2 ml de résine Ultrogel AcA 34 (IBF/LKB) équilibrée en Tris-HCl (pH 8,0, 10 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,05 %). Des fractions de 100  $\mu$ l sont recueillies, et les fractions contenant les hétéroduplex ADNc-sb/ARN sont réunies. Les ARN restants sont ensuite éliminés par hydrolyse alcaline (fractions incubées 30 minutes en présence de 0,3M NaOH,  
10 puis neutralisées en présence d'acide acétique). Enfin, les ADNc-sb sont précipités dans une solution Dextran T40 0,5  $\mu$ g (Pharmacia), 0,5 M CILi, 75 % éthanol, les culots lavés une fois à l'éthanol 75 % puis séchés sous vide et resuspendus dans un faible volume d'eau (4 à 10  $\mu$ l).

## 2.2. Ligature de l'oligonucléotide et de l'ADNc-sb

15 La ligature est effectuée par la T4 RNA ligase. Pour cela, 1  $\mu$ l d'ADNc-sb et 0,5  $\mu$ l de l'oligonucléotide BM 5' fonctionnalisé selon l'exemple 1 sont incubés avec 10 U de T4 RNA ligase (Biolab's) à 22°C pendant 48 heures, dans 10  $\mu$ l finaux de tampon Tris-HCl pH 8,0 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ASB 10 mg/ml, PEG 8000 25 %, Chlorure de cobalt hexamine 1 mM, ATP 20  $\mu$ M.

## 20 2.3. Synthèse du second brin et amplification

Vingt % du produit de la ligation a été utilisé dans des réactions d'amplification in vitro dans un volume final de 100  $\mu$ l d'un tampon Tris pH 8,9 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 5 mM, dXTP 200  $\mu$ M, gélatine 0,1 v/v, en présence de 2 U, d'AmpliTaq et des oligonucléotides BM 1-5' (Fig. 1) et Ba (Fig. 2) à la  
25 concentration de 0,1  $\mu$ M. Après 40 cycles (93°C, 30 secondes ; 51°C, 30 secondes ; 72°C, 1 minute), 1  $\mu$ l des amplifiats est prélevé et soumis à une deuxième série d'amplification (30 cycles) dans un volume final de 50  $\mu$ l, 1 U AmpliTaq et les amorces BM 2-5' et Ca (Fig. 2) ou bien BM 2-5' et Da (Fig. 2).

L'analyse des différents produits d'amplification par la technique de  
30 Southern a montré que TPH- $\alpha$  était présente dans les produits d'amplification [BM 1-5'/Ba] et [BM 2-5'/Ca]. D'autre part la forme la moins abondante TPH- $\beta$ , est amplifiée à un niveau détectable dans les produits d'amplification [BM 2-5'/Ca] et [BM 2-5'/Da]. Notons que le signal obtenu dans cette dernière amplification est visible en coloration au bromure d'éthidium.

Pour économiser le matériel, un aliquote de chacun de ces produits d'amplification a été prélevé et amplifié une trentaine de cycles avec les mêmes amorces auxquelles avaient été préalablement ajouté un phosphate en 5'. Après avoir éliminer les amorces par une chromatographie sur gel AcA 34, nous avons poli les fragments d'ADN avec de T4 DNA polymérase. Ces fragments sont ensuite clonés dans le bactériophage M13mp8 coupé SmaI et déphosphorylé (Amersham).

Le criblage des clones obtenus avec des sondes oligonucléotidiques a montré que plus de 50 % des clones obtenus contenaient des séquences hybridant avec une sonde prise dans la partie commune de la TPH (67 % des clones [BM 1-5'/Ba], 55 % des clones [BM 2-5'/Ca] et 74 % des clones [BM 2-5'/Da]. Un criblage plus fin de ces clones (avec une sonde spécifique de la forme  $-\beta$ ) montre que parmi ces clones, 1,5 % des clones TPH [BM 1-5'/Ba], 0,5 % des clones TPH [BM 2-5'/Ca] et 100 % des clones TPH [BM 2-5'/Da] sont des clones TPH- $\beta$ .

La séquence de quelques-uns des clones obtenus montre que tous les clones TPH- $\alpha$  sont des clones complets correspondant aux séquences déjà publiées. Le seul artefact rencontré est une variation dans la base terminale en 5' (G,A ou T ont été rencontrés). Les clones  $-\beta$  séquencés présentent tous en 5' 5 nouvelles bases TGCCC montrant que le procédé de l'invention permet d'obtenir des régions 5' plus complètes.

**Exemple 3 :** Construction d'une banque ADNc en partant de peu de cellules : réalisation et criblage d'une banque à partir des ARN extraits de  $10^4$  cellules PC12

Les cellules PC12 sont des cellules de phéochromocytome de rat. La moitié (environ 10 ng) des ARN totaux extraits de  $10^4$  cellules est utilisée pour une rétrotranscription amorcée par BM-3' (figure 1). A la fin de la synthèse, cette amorce est éliminée par chromatographie sur gel d'AcA 34 comme décrit précédemment.

La ligation de l'ADNc-sb avec BM-5' (préparé et fonctionnalisé comme dans l'exemple 1) est réalisée en 24 heures, dans les mêmes conditions que pour l'exemple 2.2.

La totalité de la ligation est utilisée pour une amplification in vitro dans un volume final de 100  $\mu$ l d'un tampon Tris pH 8,9 10 mM,  $MgCl_2$  1,5 mM, KCl 5 mM, dXTP 200  $\mu$ M, gélatine 0,1 v/v, en présence de 2 U d'AmpliTaq et des oligonucléotides BM 1-5' et BM 1-3' (figure 1) à la concentration de 0,1  $\mu$ M. Après 25 cycles (93°C, 30 secondes/55°C, 30 secondes/72°C, 1 minute), les petits fragments d'ADN sont éliminés par chromatographie sur une colonne de Séphacryl S 400 (Pharmacia) équilibrée en Tris-HCl pH=8.5 0,1 M. 1  $\mu$ l des éluats est prélevé et

soumis à une deuxième série d'amplification (25 cycles) dans un volume final de 50  $\mu$ l, 1U AmpliTaq et les amorces BM 2-5' et BM 2-3' (figure 1). Enfin 1  $\mu$ l des éluats est prélevé et soumis à une troisième série d'amplification (25 cycles) dans un volume final de 50  $\mu$ l, 1U AmpliTaq et les amorces BM 3-5' et BM 3-3' (figure 1) et les produits de cette amplification sont purifiés sur une colonne de Séphacryl S 400.

Par souci de conserver du matériel, un aliquote des éluats de colonne est repris et soumis à 20 cycles d'amplification [BM 3-3'/BM 3-5'] avec des amorces dont l'extrémité 5' est phosphatée. Après polissage à la T4 DNA polymérase, des "linkers" Eco RI sont ligaturés aux fragments d'ADN. Puis ceux-ci sont clonés au site Eco RI du bactériophage Lambda ZAP (Stratagène). Le criblage de la banque obtenue avec une sonde ADNc spécifique de la tyrosine hydroxylase (TH) révèle la présence de clones à une fréquence (3/10000) qui est compatible avec l'abondance de ce messenger dans ces cellules (2/10000).

**Exemple 4 :** Comparaison de l'efficacité du procédé de l'invention par rapport à la technique utilisant le "tailing"

Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé un mélange d'ARN messagers constitué de 50 fg (fentogramme =  $10^{-15}$  g) d'un ARNm de tryptophane hydroxylase (TPH) de rat synthétique et de 500 pg (picogramme =  $10^{-12}$  g) d'une échelle de poids moléculaire d'ARN constituée de 6 espèces moléculaires couvrant une masse de 0,24 à 9,5 kb (kilobase). Les ARN messagers ont été rétrotranscrits en utilisant l'amorce BM-3' précédemment décrite.

Une queue homopolymérique de dG a été ajoutée à l'extrémité 3' d'une partie des ADNc-sb en utilisant l'activité de la terminale transférase ("tailing"). Par la suite les molécules "tailées" et "non tailées" résultant de cette réaction ont subi un cycle d'amplification in vitro avec une amorce de séquence anticcomplémentaire à BM-5' et contenant en 3' une queue homopolymérique de 6 résidus dC. Afin de limiter les phénomènes d'amplification aspécifique observés au cours des expériences précédentes, cette amorce a été utilisée pour un seul cycle et en très faible quantité. Pour les autres amplifications, nous avons suivi la stratégie d'amplification emboîtée (nested PCR) déjà décrite pour l'amplification des messagers des cellules PC12.

En parallèle, une autre partie des ADNc-sb a été utilisée dans des expériences de ligation identiques à celles décrites pour l'amplification des ADNc de la lignée de cellules PC12 (exemple 3).

Des "Southern blots" des produits de la troisième amplification emboîtée (amorces BM 3-5' et BM 3-3') hybridés avec un oligonucléotide spécifique de la TPH mettent clairement en évidence la présence de séquences nucléotidiques complémentaires de la sonde dans les tubes résultant du "tailing" et du clonage selon l'invention. Cependant, un signal non spécifique important apparaît également dans les tubes témoins contenant tous les produits utilisés pour le "tailing" à l'exception de l'enzyme, alors qu'aucune amplification aspécifique n'apparaît dans les témoins de l'invention. Ceci montre clairement que le procédé de l'invention est beaucoup plus sélectif que ceux disponibles dans l'art antérieur.

### REVENDICATIONS

1. Procédé de clonage d'acides nucléiques caractérisé en ce que l'on effectue les étapes suivantes :

- 5       - dans une première étape, la ligature à l'extrémité 3' d'un produit d'extension d'amorce, d'un oligonucléotide simple brin, non complémentaire dudit produit d'extension d'amorce,
- dans une deuxième étape, la synthèse du deuxième brin au moyen d'une ADN polymérase, en utilisant une amorce complémentaire dudit oligonucléotide, et,
- 10       - dans une troisième étape facultative, l'amplification de l'ADNc-db ainsi obtenu.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le produit d'extension d'amorce est obtenu à partir d'une matrice ARN.

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le produit d'extension d'amorce est obtenu à partir d'une matrice ADN.

15       4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que, lors de la première étape, on utilise un oligonucléotide fonctionnalisé en 3' de manière à empêcher son auto-ligation.

5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide ne comportant pas de radical hydroxyle en 3'.

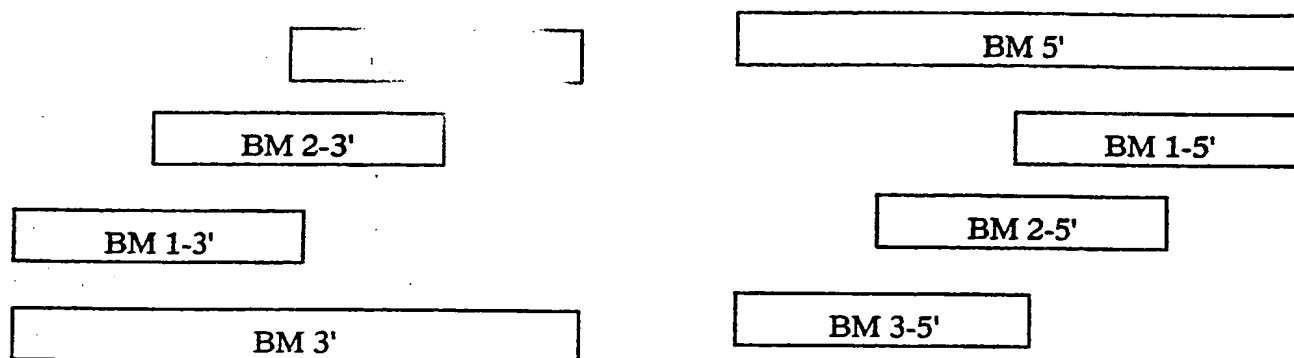
20       6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide comportant en 3' un 2'-3' didéoxyribonucléotide de formule ddXTP dans laquelle X est choisi parmi les bases connues entrant dans la composition des acides nucléiques.

25       7. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide comportant en 3' une fonction amine.

8. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide ne formant pas de structures secondaires.

9. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un oligonucléotide dont les bases situées en 5' forment un ou plusieurs sites de coupure reconnus par des enzymes de restriction.
10. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on utilise un  
5 oligonucléotide d'une longueur au moins égale à 20 mer.
11. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la ligation est effectuée en présence d'une enzyme capable de lier des acides nucléiques simple brin.
12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'enzyme est la T4 RNA ligase.
- 10 13. Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que la ligation est réalisée à une température de 20°C environ, pendant une période de 24 à 96 heures.
14. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que pour la troisième étape, on utilise en plus une deuxième amorce, correspondant à une région de la partie 5' du produit d'extension d'amorce.
- 15 15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'on effectue plusieurs cycles d'amplification.
16. Trousse pour la mise en oeuvre du procédé de clonage d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 15 comprenant l'oligonucléotide de ligation et éventuellement l'enzyme permettant sa ligation au produit d'extension d'amorce.
- 20 17. Trousse selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle comprend également les amorces et enzymes permettant la rétrotranscription d'une matrice initiale ARN en ADNc-sb.
- 25 18. Trousse selon l'une des revendications 16 ou 17 caractérisée en ce qu'elle comprend également les amorces et enzymes permettant l'amplification de l'acide nucléique cloné.
19. Utilisation d'une trousse selon l'une quelconque des revendications 16 à 18 pour réaliser des banques d'ADNc, ou pour cloner les régions 5' d'ARN messagers, ou encore pour l'étude et la caractérisation moléculaire de séquences génomiques.

PL. I/3

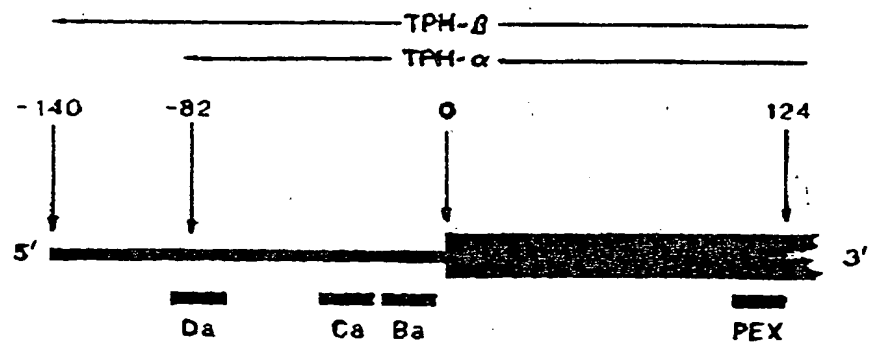


| Nom     | 5' Séquence 3'                                  |
|---------|-------------------------------------------------|
| BM 5'   | GCATTGCATCATGATCGATCGAATTCTTTAGTGAGGGTTAATTGCC  |
| BM 1-5' | GGCAATTAACCCTCACTAAAG                           |
| BM 2-5' | TCACTAAAGAATTCGATCGATC                          |
| BM 3-5' | CGATCGATCATGATGCAATGC                           |
| BM 3'   | CGAATACGACTCACTATAGGAAGCTGCGGCCGCTGCAGTAC[T] 14 |
| BM 1-3' | CGAATACGACTCACTATAGG                            |
| BM 2-3' | ACTCACTATAGGAAGCTGCG                            |
| BM 3-3' | AGGAAGCTGCGGCCGCT                               |

Figure 1



PL. II/3



| Nom | 5' Séquence 3'           |
|-----|--------------------------|
| Ba  | GGTGAATCTGAATGAAGATGACCC |
| Ca  | AGTGGGCAGGATCCGGCACT     |
| Da  | ACGGGAGCTGCCGCCTC        |
| PEX | GCGCTGAAAATCTTCCAGGAAACC |

Figure 2

PL. III/3

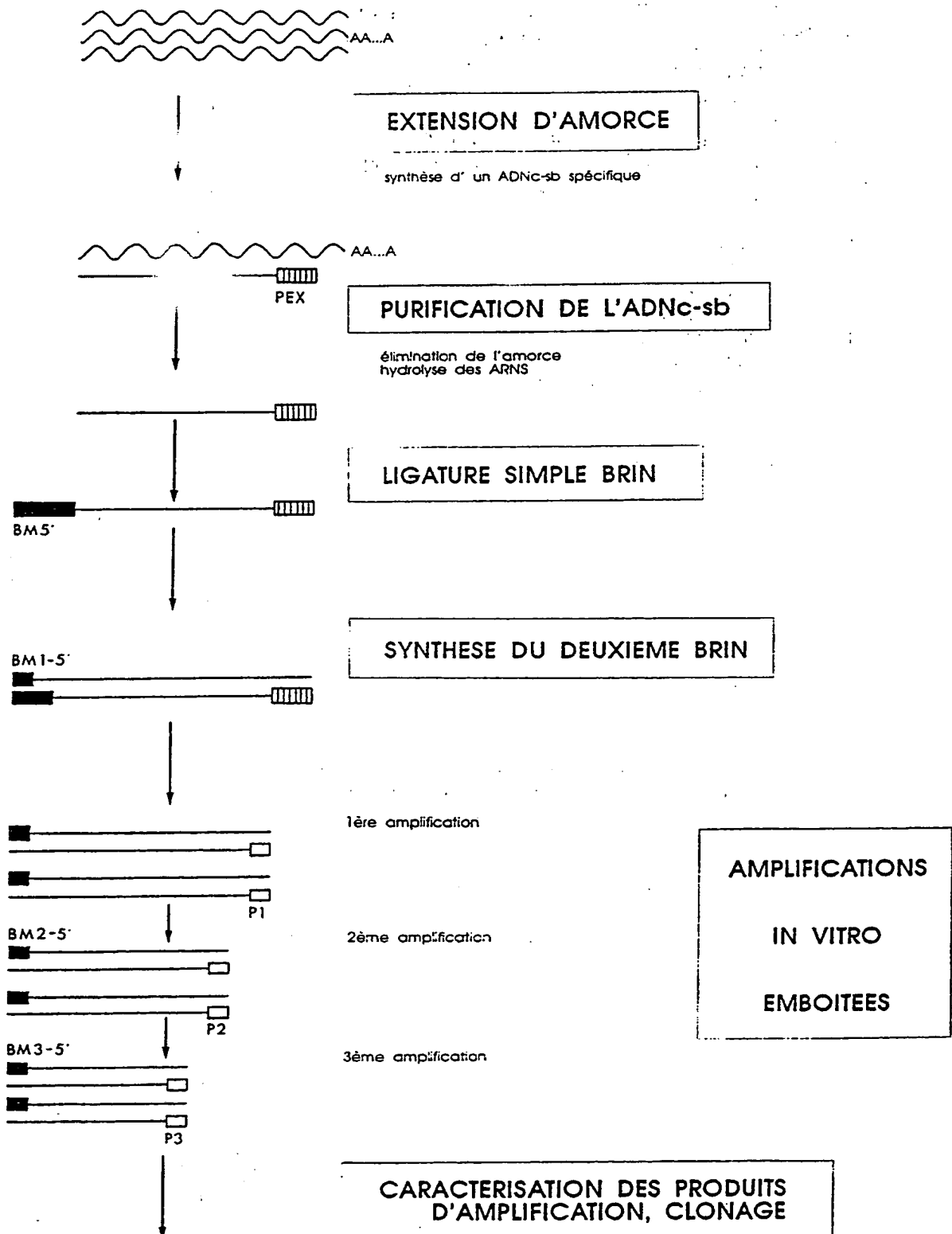


Figure 3

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9108294  
FA 459652  
Page 1

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Revendications<br>concernées<br>de la demande<br>examinée |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | WO-A-9 009 457 (BIOGEN, INC.)<br>* le document en entier *<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | WO-A-9 001 065 (GENELABS INCORPORATED)<br>* page 1, ligne 30 - page 6, ligne 12;<br>revendications; figures *<br>---                                                                                                                                                                                                                    | 1                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | GENE.<br>vol. 81, 1989, AMSTERDAM NL<br>pages 295 - 306;<br>AKOWITZ A. ET AL.: 'A novel cDNA/PCR strategy<br>for efficient cloning of small amounts of<br>undefined RNA'<br>* le document en entier *<br>---                                                                                                                            | 1                                                         |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | GENE.<br>vol. 34, 1985, AMSTERDAM NL<br>pages 305 - 314;<br>COLECLOUGH C. ET AL.: 'Use of<br>primer-restriction-end adapters in a novel cDNA<br>cloning strategy'<br>* abrégé; figures 1,2 *<br>---                                                                                                                                     | 1                                                         |
| T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | NUCLEIC ACIDS RESEARCH.<br>vol. 19, no. 19, 11 Octobre 1991, ARLINGTON,<br>VIRGINIA US<br>pages 5227 - 5232;<br>DUMAS MILNE EDWARDS J.B. ET AL.:<br>'Oligodeoxyribonucleotide ligation to<br>single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5'<br>ends of mRNAs and for constructing cDNA<br>libraries by in vitro amplification'<br>--- |                                                           |
| T                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | METHODS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY<br>vol. 2, no. 6, 1991, NEW YORK, USA<br>pages 273 - 279;<br>WEXLER A. ET AL.: 'A procedure to amplify cDNA<br>from dsRNA templates using the polymerase chain<br>reaction'                                                                                                                   |                                                           |
| Date d'achèvement de la recherche<br>31 MARS 1992                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Examinateur<br>LUZZATTO E. R.                             |
| <p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br/>autre document de la même catégorie<br/>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication<br/>ou arrière-plan technologique général<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure<br/>à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date<br/>de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                           |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**ATTACHMENT I****CHEMICAL ABSTRACTS VOL. 118, 1993, PAGE 320**

118:227537j A method for the construction of cDNA banks. Dumas Milne Edwards, Jean Baptiste; Mallet, Jacques (Rhone Poulenc Rorer, S.A.) FR Demande [application] 2,678,639 (Cl. C12Q1/68), 08 Jan 1993, Appl. 91/8,294, 03 Jul 1991; 19 pp. A method for prepn. of double-stranded cDNA and its cloning without use of the rare formation of the 3'-hairpin loop is described. The method involves ligating a single-stranded oligonucleotide to the 3'-end of the extension product; the second strand is then synthesized from a primer complementary to the ligated oligonucleotide and sequences are then optionally amplified by PCR using primers derived from these oligonucleotides. The method has low requirements for RNA and is rapid and efficient. The method may also be applied to cloning of genomic sequences. The use of the method to clone cDNAs for rat tryptophan hydroxylase isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  and in the prepn. Of a cDNA bank from mRNA of  $10^4$  PC12 cells were demonstrated.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**